ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 32, 4, 1998

УДК 576.893.161.13 + 577.21

К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНОСИСТЕМАТИКЕ ТРИПАНОЗОМАТИД ИЗ НАСЕКОМЫХ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С УНИВЕРСАЛЬНЫМИ ПРАЙМЕРАМИ (УП—ПЦР)

© С. А. Подлипаев, И. В. Мокроусов, С. А. Булат

Обсуждаются результаты первого применения полимеразной цепной реакции с универсальным праймером (УП—ПЦР) для классификации трипанозоматид насекомых и растений. Построена дендрограмма различий для 14 культур трипанозоматид из насекомых и 3 из растений. Показана очень широкая специфичность трипанозоматид насекомых, например, степень сходства двух изолятов паразитов, выделенных из разных отрядов насекомых, оказалась выше, чем у изолятов из одного вида хозяев. Подтверждается реальность рода *Proteomonas*. Полученные результаты демонстрируют высокий уровень гетерогенности изолятов, относимых к роду *Leptomonas*, который представляется искусственной группой. Очевидно, что количество имеющихся родов недостаточно для описания реального разнообразия трипанозоматид. Примененный метод позволяет получить иерархически организованную систему кластеров, объединяющих те или иные изоляты. Таким образом, представляется, что применение традиционной концепции вида (а не клональной теории) и соответственно традиционных таксономических категорий, вполне адекватно для трипанозоматид насекомых.

Традиционно внимание исследователей в первую очередь привлекали патогенные представители сем. Trypanosomatidae, возбудители опаснейших заболеваний человека и домашних животных. В последние годы повышенный интерес вызывают необычная организация и функционирование генома трипанозоматид и ядерного, и митохондриального, а также проблемы эволюции этой группы животных.

Систематика трипанозоматид сложна и запутана, морфологические методы мало эффективны в связи с бедностью их клетки информативными признаками, размерные характеристики ненадежны (Wallace e. a., 1983; Подлипаев, Лобанов, 1996). Попытки применить более оригинальные критерии такие, например, как морфология колоний на твердой питательной среде, весьма трудоемки (Подлипаев, 1985; Подлипаев и др., 1990).

Родовые критерии основаны на определенных морфологических типах клеток (Hoare, Wallace, 1966), однако практически только роды *Trypanosoma* и *Blastocrithidia* могут быть относительно надежно диагностированы по этим критериям. Видовые критерии неразработаны, традиционно из нового хозяина описывался и новый вид паразита. Специфичность низших трипанозоматид трактуется разными авторами совершенно произвольно, что связано с уже упомянутым отсутствием надежных определительных признаков.

Давно признано необходимым сопровождать описание видов трипанозоматид обязательным выделением лабораторных культур (Wallace e. a., 1983), однако это не всегда возможно при проведении полевых исследований. Ограниченное количество культур трипанозоматид насекомых, имеющихся в лабораториях мира, не позволяет надежно решать вопросы специфичности и филогении трипанозоматид.

Взаимоотношения среди так называемых низших трипанозоматид — гомоксенных и гетероксенных паразитов насекомых и растений — исследованы совершенно недостаточно. Между тем исследование именно этих трипанозоматид может пролить свет на запутанные проблемы эволюции паразито-хозяинных отношений между трипанозоматидами, позвоночными, насекомыми и растениями. Обнаружение того факта, что трипанозоматиды являются широко распространенными паразитами растений, считается одним из самых значительных событий в протозоологии за последнее время (Vickerman, 1994). Высказано предположение о возможности возникновения новых заболеваний растений, вызываемых трипанозоматидами (Podlipaev, 1996). Возможность того, что трипанозоматиды насекомых могут паразитировать и в растениях, также не может быть исключена.

В последнее время возрождаются представления о паразитических простейших как о системе отдельных клонов, не организованных в систему вида. В связи с этим предлагается отказаться от использования традиционных таксономических категорий и ввести единственную таксономическую единицу — естественный клон (natural clone) (Tibayrenc e. a., 1990). Высокий уровень клональной изоляции у паразитических организмов представляется очевидным, однако только конкретные исследования способны ответить на вопрос об адекватности применения традиционных систематических категорий. Если при применении различных методов мы получим иерархически организованные взаимосвязи между изолятами, применение традиционных таксономических категорий может быть вполне оправданным.

Отсутствие информативных морфологических признаков делает использование методов молекулярной систематики не только полезным, но и совершенно необходимым для изучения трипанозоматид. Такие методы применялись в основном к патогенным трипанозоматидам позвоночных (Булат и др., 1992а; Strelkova e. a., 1997). В последнее время ряд работ посвящен патогенным трипанозоматидам растений. Трипанозоматиды насекомых исследовались лишь попутно для сравнения с патогенными формами, причем исследователи имели дело только с несколькими изолятами, зачастую выделенными из природы давно и имеющими сложную лабораторную историю (Muller e. a., 1994, 1997; Lukes e. a., 1997). Лишь структура кинетопластной ДНК изучена у значительного числа культур трипанозоматид насекомых (Kolesnikov e. a., 1990).

Для того чтобы реконструировать систему, мы должны выявить естественные группы изолятов среди трипанозоматид насекомых, для чего необходимы исследования многочисленных новых культур.

В настоящем исследовании впервые на большой выборке изолятов трипанозоматид из насекомых (14 культур) и вдобавок трех изолятов из растений методом полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами (УП—ПЦР) (Булат, Мироненко, 1990; Булат и др., 1992а) сделана попытка изучить их генетическую (геномную) изменчивость и выяснить их взаимоотношения, используя полиморфизмы ПЦР профилей в качестве признаков для нумерического анализа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В настоящей работе использовалась коллекция изолятов низших трипанозоматид, выделенных из клопов Северо-Запада России по единой методике (Подлипаев, 1985; Подлипаев, Фролов 1987). Настоящая коллекция является одной из самых полных и разносторонне охарактеризованных региональных коллекций трипанозоматид насекомых. В анализ включены также культуры трипанозоматид, традиционно использующиеся в исследованиях других лабораторий.

Изолят P из *Panorpa communis* является единственной культурой в коллекциях мира, выделенной из насекомых отряда Mecoptera.

Трипанозоматид наращивали на среде BHI (Brain Heard Infusion, DIFCO) с добавлением гемина (10 мкг/мл); 5-дневную культуру осаждали центрифугированием при 3000 об/мин, 15° в течение 5 мин, дважды отмывали свежей средой, осаждая в том же режиме. Окончательно отмытый осадок консервировали 70 %-ным спиртом.

Метод УП—ПЦР аналогичен известным техникам AP—PCR (arbitrary primed PCR) (Welsh, McClelland, 1990) и RAPD—PCR (random amplified polymorphic DNA PCR) (Williams e. a., 1990), но отличается от них дизайном праймеров и ПЦР-протоколом (Bulat e. a., 1994).

Техника УП—ПЦР, положенная в основу метода видоидентификации организмов и оценки их генетического родства (Булат, Мироненко, 1992; Мокроусов, Булат, 1992, Naumov e. a., 1997), предоставляет возможность детального анализа структуры генома изолятов. Как было показано, электрофоретические спектры ДНК, амплифицированной с универсальными праймерами, в основном видоспецифичны, а внутривидовая изменчивость может быть описана в форме УП—ПЦР полиморфизмов — незначительно измененных типов этих спектров. При сравнении УП—ПЦР паттернов изолятов последние можно сгруппировать по критерию сходства структуры их генома (Bulat e. a., 1994; Naumov e. a., 1997).

Анализ проводили на клеточных лизатах, полученных следующим образом: 103—106 клеток суспендировали в 200 мкл лизирующего буфера (50 мМ Tris.HCl pH = 7.8, 50 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, 1 %-ного тритона X—100, 1 мг/мл Proteinase K (Sigma) и инкубировали 30 мин при 65°. Затем лизаты прогревали 10 мин при 100° и клеточные остатки осаждали центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 2 мин. Полученный лизат разводили в 10 раз TE буфером (Sambrook e. a., 1989) и использовали в ПЦР в количестве 0.1—1 мкл на реакцию (Булат и др., 1992б).

В качестве универсального праймера использовали праймер L45 (Мокроусов, Булат, 1992): 5' — GTAAAACGACGGCCAGT. УП—ПЦР проводили на термоциклере, изготовленном в ПИЯФ РАН (С.-Петербург), в режиме 30 циклов при температуре: 92° — 50 сек (плавление ДНК), 55° — 90 (отжиг праймера), 69° — 60 сек (синтез ДНК). Первое плавление ДНК проводили при 94° в течение 2.5 мин, последний синтез ДНК — 3 мин. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл. ПЦР проводили в буфере (20 мМ Tris.HCl, pH = 8.8), 10 мМ $(NH4)2SO_4$, 2.8 мМ $MgCl_2$, 50 мкг/мл BSA («Sigma»), содержащем dNTP (LKB — Farmacia) по 0.2 мМ каждый, 2 ед. термостабильной полимеразы Tth (любезно предоставлена О. К. Кабоевым, ПИЯФ РАН), около 40—80 нг праймера и 20—200 нг геномной ДНК. Для уверенности в надежности ПЦР профилей каждый образец амплифицировали до 3 раз, варьируя количество ДНК до 10 раз.

Продукты УП—ПЦР разделяли в 1.7 %-ном агарозном геле (Sambrook e. a., 1989). Окрашенные бромистым этидием гели (УП—ПЦР профили) фотографировали в УФ-свете.

Результаты электрофорезов обрабатывались с использованием программы Taxotron Package (Patrick A. D. Grimmons, Copyrigth 1994, Institut Pasteur, Paris).

Степень различия изолятов определялась с использованием коэффициента Дайса (Dice's distance)

$$\mathrm{Dij} = 1 - \frac{2C}{\mathrm{Ni} + \mathrm{Nj}},$$

где C — число полос, общих для культур I и J; N — общее число полос в культурах I и J соответственно. Для построения дендрограмм использовался метод UPGMA — Unweighted Pair Group Method of Analisis (рис. 1, 2).

Насекомые были собраны в 3 различных регионах на Северо-Западе России — в Ленинградской (несколько точек), Псковской и Калининградской обл., 7 видов насекомых принадлежат к 5 родам отряда Hemiptera, относящихся к 3 семействам (Gerridae, Miridae и Nabidae), и один вид — (*Panorpa communis*) относится к отряду Mecoptera (см. таблицу).

Четыре изолята выделены из клопов сем. Nabidae, из них три — из одного вида *Nabicula flavomarginata*, а один — из представителя рода *Nabis*, очень

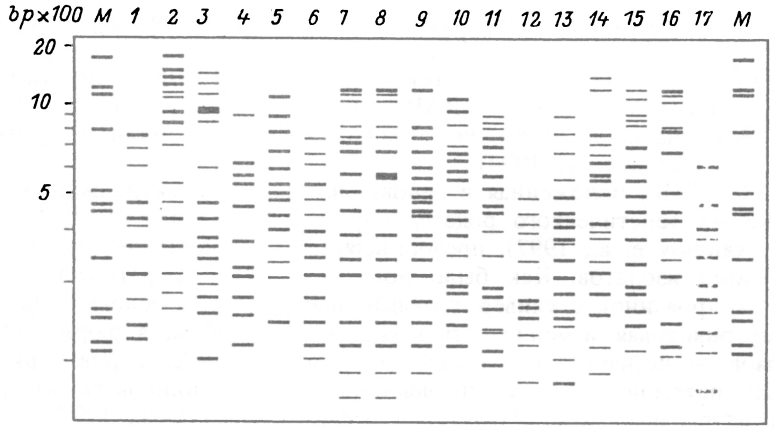

Рис. 1. УП—ПЦР паттерны изолятов трипанозоматид (праймер L45). Схема получена с помощью Taxotron Package.

1—17 — номера дорожек, соответствующие номерам изолятов на дендрограмме и в таблице; *М* — маркеры молекулярных весов (лямбда ДНК, расщепленная PstI эндонуклеазой); *bp* — количество пар оснований. 1.7 % агарозный гель.

Fig. 1. UP—PCR patterns of trypanosomatid isolates (primer L45). Schemes obtained by means of Taxotron Package.

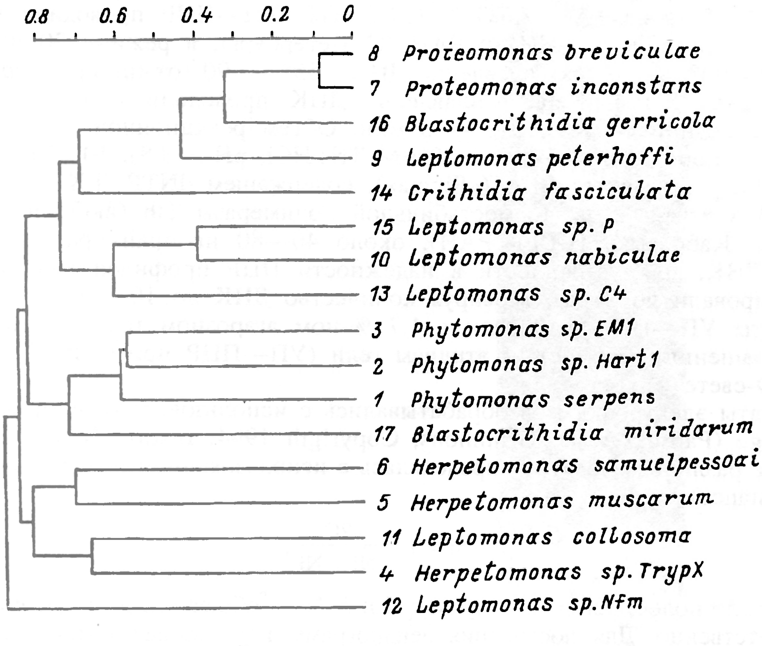

Рис. 2. Дендрограмма различий исследованных культур трипанозоматид, полученная методом UPGMA на основе УП—ПЦР полиморфизмов по праймеру L45. Вверху приведена шкала различий.

1—17 — номера изолятов соответствуют номерам дорожек на рис. 1 и номерам в таблице.

Fig. 2. Dendrogram of differences between examined trypanosomatid cultures obtained by the UPGMA method based on UP—PCR polymorphysm by the primer L45.

Культуры трипанозоматид, использованные в работе

Trypanosomatid stock origins

Название изолята	Хозяин	Источник культур
Изоляты из растений		
Phytomonas serpens 1G (Gibbs, 1957) (*1*)	*Lycopersicon esculentum*	Получена от Dr. D. Maslov University of California-Riverside, USA Выделена в Бразилии
Phytomonas sp. Hartl (*2*)	*Cocos nucifera*	Получена от Prof. M. Dollet CIRAD-CP Montpellier, France Выделена во французской Гайане
Phytomonas sp. *EM1* (*3*)	*Euphorbia pinea*	Получена от Prof. M. Dollet CIRAD-CP Montpellier, Франция Выделена во Франции
Изоляты из насекомых		
Отряд Mecoptera		
Leptomonas sp. ? *P* (*15*)	*Panorpa communis*	Выделена в Ленинградской обл. в 1988 г.
Отряд Diptera		
Crithidia fasciculata Leger, 1902 (*14*)	?	Получена от докт. биол. наук А. А. Колесникова, МГУ
Herpetomonas sp.? *TrypX* (*4*)	*Musca domestica*	Получена от Dr. J. Lukas, Inst. of Parasitology, Чехия
Herpetomonas muscarum (Leidy, 1865) (*5*)	*Musca domestica*	Получена от Dr. D. Maslov University of California-Riverside, США Выделена в США
Отряд Hemiptera		
Herpetomonas samuelpessoai Roitman e. a., 1976 (6)	*Zelus leucogrammus*	Получена от Dr. Maslov University of California-Riverside, США
Proteomonas inconstans Podlipaev, e. a., 1990 (*7*)	*Calocoris sexguttatus*	Выделена в Псковской обл. в 1986 г.
Proteomonas brevicula (Frolov, e. a., 1989) (*8*)	*Nabis brevis*	Тот же
Leptomonas peterhoffi Podlipaev, 1985 (*9*)	*Nabicula flavomarginata*	Выделена в Ленинградской обл. в 1982 г.
Leptomonas nabiculae Podlipaev, 1985 (*10*)	Nabicula flavomarginata	Тот же
Leptomonas collosoma Wallace e. a., 1960 (*11*)	Gerris dissortis	Получена от Dr. D. Maslov, University of California-Riverside, США Выделена в США.
Leptomonas sp. Nfm (*12*)	*Nabicula flavomarginata*	Выделена в Псковской обл. в 1991 г.
Leptomonas sp. ? *C4* (*13*)	*Gerris rufoscutellatus*	Выделена в Ленинградской обл. в 1987 г.
Blastocrithidia gerricola Podlipaev, 1985 (*16*)	*Gerris lacustris*	Выделена в Калининградской обл. в 1981 г.
Blastocrithidia miridarum Podlipaev et Frolov, 1978 (*17*)	*Lygocoris lucorum*	Выделена в Псковской обл. в 1984 г.

Примечание. Номера культур (в скобках) в таблице соответствуют номерам дорожек на рис. 1 и 2; ? — невозможность уверенного отнесения изолята к данному роду на основании морфологических признаков.

близкого к роду *Nabicula*. Насекомые одного вида были собраны как в различных точках (культуры *10*, *12*) так и в одном месте (культуры *9*, *10*) (см. таблицу).

Кроме того, два изолята (*13*, *16*) из разных видов рода *Gerris* (сем. Gerridae) выделены в разных географических точках, а две культуры из различных родов клопов, относящихся к сем. Miridae, получены из одного района (*7*, *17*).

В одном районе выделялись и культуры из насекомых, относящихся как к разным семействам одного отряда полужесткокрылых (культуры *7*, *8*, *17* в Псковской обл.), так и к представителям разных отрядов насекомых (культуры *9*, *10*, *13* — из Hemiptera и *15* — из Mecoptera в Ленинградской обл.) (см. таблицу).

Такое распределение исследованных культур позволяет судить о степени специфичности инвазии на уровнях вида, рода и семейства, а также о приуроченности паразитов к тому или иному району.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследованиях трипанозоматид насекомых, а особенно при выделении культур из зараженных хозяев, остро стоит вопрос неспецифической или смешанной инвазий. Известно, что при экспериментальном заражении неспецифический паразит способен выживать в кишечнике насекомого до 7 дней (Фролов, 1987). В этом исследовании мы впервые в мировой литературе можем быть уверены, что по меньшей мере одна культура — *Protemonas brevicula* — представляет специфического паразита, так как культура была выделена из клопа ранней весной, когда насекомое находилось в состоянии зимней имагинальной диапаузы. То, что паразит был жизнеспособен в конце зимней диапаузы, должно являться свидетельством специфичности инвазии.

Проведенное исследование, результатом которого является UPGMA дендрограмма, в целом свидетельствует о том, что большинство исследованных культур достаточно гетерогенны по структуре генома — имеют гетерогенные УП-ПЦР профили (рис. 1) и 4 главных кластера с многочисленными субкластерами и большими дистанциями (рис. 2).

Культуры, изолированные из одного хозяина (*Nabicula flavomarginata*) в одном и том же районе (*9* — *Leptomonas peterhoffi* и *10* — *L. nabiculae*), не формируют собственного кластера на дендрограмме так же, как и изоляты из того же хозяина, выделенные в разных пунктах (*10* — *L. nabiculae* и *12* — *Leptomonas* sp. Nfm). То же относится и к культурам, выделенным из разных видов рода *Gerris* в разных пунктах (*11* — *L. collosoma* из США, *13* — *Leptomonas* sp.? C4 из Ленинградской обл., *16* — *Blastocrithidia gerricola* из Калининградской обл.). В разных частях дендрограммы помещаются и изоляты, полученные из клопов сем. Miridae в одном и том же пункте (*7* — *Proteomonas inconstans* и *17* — *Blastocrithidia miridarum*). На разных ветвях полученного дерева расположены и культуры, выделенные из представителей отряда Diptera (*4* — *TrypX*, *5* — *Herpetomonas muscarum*, *14* — *Crithidia fasciculata* (рис. 2).

Напротив, культуры из клопов *Nabicula flavomarginata* (*10* — *L. nabiculae*) и из представителя другого отряда насекомых (*Panorpa communis*: Mecoptera, изолят *15* — *Leptomonas* sp. P), выделенные в одном и том же месте, являются близкородственными (рис. 2). Степень сходства двух изолятов, паразитирующих в разных отрядах насекомых, оказалась значительно выше, чем у изолятов, выделенных из одного вида насекомых (например, изоляты *9* и *12*), т. е. показано отсутствие специфичности к разным отрядам насекомых.

Таким образом, очевидно, что роды, виды или изоляты трипанозоматид из насекомых не приурочены к видам, родам или семействам хозяев, а, возможно, и к их отрядам. Полученные данные демонстрируют очень широкую специфичность трипанозоматид насекомых. Есть ли специфичность на уровне класса насекомых, предстоит еще выяснить.

Представители рода *Proteomonas* формируют вполне определенный кластер из двух видов собственно рода *Proteomonas* (Подлипаев и др., 1990), что подтверждает реальность этого рода, последнего по времени описания рода трипанозоматид.

Очень близки к группе протеомонасов (вероятно, входят в этот род) две культуры, первоначально определенные как *Leptomonas peterhoffi* и *Blastocrithidia gerricola* (Подлипаев, 1985), причем последняя изолирована на расстоянии около 1000 км от места выделения типичных *Proteomonas* и из другого семейства клопов (см. таблицу; рис. 2).

Blastocrithidia gerricola была описана как *Blastocrithidia* на основании наличия опистоматигот в клопах, и одновременно было высказано предположение, основанное на морфологии клеток в культуре, что имела место смешанная инвазия и в культуру мог быть выделен иной, чем *Blastocrithidia*, организм (Подлипаев, 1985). В настоящее время проводятся морфологические исследования этих двух культур. Имеющиеся предварительные данные свидетельствуют в пользу переноса этих двух видов в род *Proteomonas*.

Полученные результаты указывают на очень высокий уровень генетической гетерогенности изолятов, относимых к роду *Leptomonas*, — они все имеют разные УП—ПЦР профили (рис. 1) и размещаются в различных кластерах дендрограммы (рис. 2). Изолят *12* — *Leptomonas* sp. Nfm, представленный типичными промастиготными клетками и по морфологическим признакам, бесспорно, входящий в род *Leptomonas*, максимально удален от всех других лептомонасов, как, впрочем, и от других исследованных изолятов (рис. 2). На основании этого можно считать, что род *Leptomonas* представляет искусственную группу.

Становится все более и более очевидным, что по меньшей мере некоторые роды трипанозоматид являются искусственными, а количество имеющихся родов недостаточно для описания реального разнообразия этих жгутиконосцев, что требует перестройки системы трипанозоматид.

Из полученных данных следует (рис. 2), что примененный метод позволяет получить иерархически организованную систему кластеров, в ряде случаев соответствующую системе, построенной на основании других признаков (*Proteomonas*, *Phytomonas*, *Herpetomonas*). Таким образом, при очевидно высоком уровне клональной изоляции у трипанозоматид как паразитических организмов нет необходимости считать трипанозоматид насекомых и растений, представленными множеством независимых клонов. Полученные данные скорее свидетельствуют в пользу приемлемости традиционной концепции вида для трипанозоматид насекомых и растений. Применение обычных таксономических категорий — вида, рода и т. д. — представляется вполне адекватным.

Весьма интересным представляется размещение трипанозоматид растений (изоляты *1*—*3*) среди трипанозоматид насекомых. В работе, где были использованы иные методы (Marche e. a., 1995), представители рода *Phytomonas* четко отделены от трипанозоматид насекомых, однако в других работах (Muller e. a., 1994, 1997) трипанозоматиды растений образуют общие кластеры с трипанозоматидами насекомых. Взаимоотношения внутри кластера *Phytomonas* (удаленность *Ph. serpens* от более близкородственных изолятов *EM1* и *Hart1*) на нашей дендрограмме соответствуют данным, полученным другими авторами, что подтверждает адекватность использованного нами метода.

Вместе с тем вопрос о филогенетической позиции изолятов трипанозоматид растений среди изолятов из насекомых нуждается в дальнейшем исследовании, так как во всех предыдущих работах использовался небольшой и однообразный набор трипанозоматид насекомых. В настоящем исследовании впервые использовано количество изолятов из насекомых, значительно превышающее число изолятов из растений. Известно, что введение в анализ новых культур может довольно существенно изменить топологию дендрограмм, поэтому для корректного обсуждения вопроса в дальнейшем необходимо использовать сравнимые по количеству наборы изолятов. Можно предполагать, что в этом случае удастся выявить предков жгутиконосцев из растений среди конкретной группы трипанозоматид насекомых.

Представленное исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 95-04-11837).

Список литературы

Булат С. А., Мироненко Н. В. Видовая идентичность фитопатогенного гриба Pyrenophora teres Drechsler и Pyrenophora graminea Ito and Kuribayashi // Микол. и фитопатол. 1990. Т. 24, N 5. С. 435—441.

Булат С. А., Мироненко Н. В. Полиморфизм дрожжеподобного гриба Aureobasidium pullulans (De Bary), выявляемый в полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами: состояние дивергенции вида // Генетика. 1992. Т. 28, N 4. С. 19—29.

Булат С. А., Стрелкова М. В., Сысоев В. В. Идентификация маркерных штаммов Leishmania maior, L. turanica, L. gerbilli методом полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами // Мед. паразитол. 1992а. N 1. С. 21—22.

Булат С. А., Кабоев О. К., Мироненко Н. В., Ибатуллин Ф. М., Лучкина Л. А., Суслов А. В. Полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами для изучения геномов // Генетика. 1992б. Т. 28, N 5. С. 19—28.

Мокроусов И. В., Булат С. А. Различение биологических видов гриба Aureobasidium pullulans (De Bary) методом полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами. Генетика. 1992. Т. 28, N 4. С. 31—38.

Подлипаев С. А. Новые виды низших трипанозоматид из полужесткокрылых (Heteroptera) семейств Gerridae и Nabidae: стадии их жизненных циклов в природе и при культивировании в лаборатории // Жизненные циклы простейших. Л., 1985, с. 35—47 (Тр. ЗИН АН СССР. Т. 129).

Подлипаев С. А., Лобанов А. Л. Использование размерных признаков для дифференциации низших трипанозоматид // Паразитология. 1996. Т. 30, вып. 4. С. 324—332.

Подлипаев С. А., Фролов А. О. Описание и лабораторное культивирование Blastocrithidia miridarum sp. n. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) // Паразитология. 1987. Т. 21, вып. 4. С. 545—552.

Подлипаев С. А., Фролов А. О., Колесников А. А. Proteomonas inconstans n. gen., n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) — паразит клопа Calocoris sexguttatus (Hemiptera: Miridae) // Паразитология. 1990. Т. 24, вып. 4. С. 339—345.

Фролов А. О. Жизненные циклы низших трипаносоматид — паразитов полужесткокрылых насекомых: Автореф. канд. дис. ... канд. биол. н. Л., 1987, 19 с.

Bulat S. A., Mironenko N. V., Lapteva M. N., Strelchenko P. P. Polymerase chain reaction with universal primers (UP—PCR) and its appication to plant genome analysis. Conservation of Plant Genes II: Utilization of ancient and modern DNA // Missouri Botanical Garden, St. Louis. 1994. Vol. 48. P. 113—129.

Hoare C. A., Wallace F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology // Nature, London. 1966. Vol. 212. P. 1385—1386.

Kolesnikov A. A., Maslov D. A., Podlipaev S. A. Comparative restriction enzyme cleavage analysis of kinetoplast DNA from the lower trypanosomatids isolated in the North-West region of the USSR // Arch. Protistenkd. 1990. Bd 138. S. 239—250.

Lukes J., Jirku M., Kral'ova I., Hollar L., Maslov D. A. Analysis of ribosomal RNA genes suggests that trypanosomes are monophyletic // J. Mol. Evol. 1997. Vol. 44. P. 521—527.

Marche S., Roth C., Philippe H., Dollet M., Baltz T. Characterization and detection of plant trypanosomatids by sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene // Mol. Biochem. Parasitol. 1995. Vol. 71. P. 15—26.

Muller E., Gargani D., Shaeffer V., Stevens J., Fernanders-Beserra C., Sanchez-Moreno M., Dollet M. Variability in the phloem restrited plant trypanosomes (Phytomonas spp.) associated with wilts of cultivated crops // European J. Plant Pathology. 1994. Vol. 100. P. 425—434.

Muller E., Gargani D., Banuls A. L., Tibayrenc M., Dollet M. Classification of plant trypanosomatids (Phytomonas spp.): parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis // Parasitology. 1997. Vol. 115. P. 403—409.

Naumov G. I., Naumova E. S., Kondratieva V. I., Bulat S. A., Mironenko N. V., Mendonca-Hagler L. C., Hagler A. N. Genetic and molecular delineation of three sibling species in the Hansenula polymorpha complex // System. Appl. Microbiol. 1997. Vol. 20. P. 50—56.

Podlipaev S. A. Phytoflagellates (Trypanosomatidae: Mastigophora): the pathogenicity of new plant diseases and their potential as bilogical control agents // Proc. IX Intern. Symp. Biol. Control of Weeds. University of Cape Town, 1996. P. 337.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 1. Cold Spring Harbor: CSH Lab. Press, 1989. p. 253.

Strelkova M. V., Pacheco R. S., Bulat S. A., Rakitskaya T. A. Comparison of some molecular-genetic techniques for identification of Leishmania circulating in natural foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis in the Central Asia region // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 1997. Vol. 92, N 1. P. 109—114.

Tibayrenc M., Kjellberg F., Ayala F. J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of Entamoeba, Giardia, Leishmania, Naegleria, Plasmodium, Trichomonas and Trypanosoma and their medical and taxonomical consequences // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. Vol. 87. P. 2414—2418.

Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates // Int. Journ. Parasitol. 1994. Vol. 24, N 8. P. 1317—1331.

Wallace F. G., Camargo E. P., McGhee E. P., Roitman I. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids // J. Protozool. 1983. Vol. 30. P. 308—313.

Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // Nucl. Acids. Res. 1990. Vol. 18. P. 7213—7218.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. 1990. Vol. 18. P. 6531—6535.

ЗИН РАН, Санкт-Петербург, 199034;
Санкт-Петербургский институт им. Пастера,
197101; Петербургский институт ядерной физики (ПИЯФ)
РАН, Гатчина Ленинградской обл., 188350

Поступила 29.12.1997

TOWARDS MOLECULAR SYSTEMATICS OF TRYPANOSOMATIDS FROM INSECTS BY MEANS OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION WITH UNIVERSAL PRIMERS (UP—PCR)

S. A. Podlipaev, I. V. Mokrousov, S. A. Bulat

Key words: trypanosomatids from insects, systematics, polymerase chain reaction, universal primers.

SUMMARY

The results of the first using of universal primer — polimerase chain reaction (UP—PSR) for the classification of trypanosomatids from insects and plants are

presented. The dendrograms of 14 trypanosomatids cultures from insects and 3 cultures from plants derived from genetic distances were obtained. Wide specificity of insect trypanosomatids is demonstrated — for example two isolates of parasites from different insects orders appeared to be more similiar than isolates from the same host insect species. The reality of genus *Proteomonas* is confirmed. The results demonstrate the high level of heterogeneity of the isolates referring to the genus *Leptomonas* which seems to be an artificial group. It is obvious that the amount of existing genera is not enough for the description of trypanosomatids biodiversity. The applied method allows to obtain the hierarchical clusters of isolates. Thus, the system of insects trypanosomatids may be discussed in terms of traditional taxonomy.